

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN(11)Publication number : **08-163987**(43)Date of publication of application : **25.06.1996**

(51)Int.Cl.

C12N 15/09// **C12N 1/21**(21)Application number : **06-312262**(71)Applicant : **RES DEV CORP OF JAPAN
IMAMOTO FUMIO
TAKARA SHUZO CO LTD
FURUSAWA MITSURU
FUJITSU LTD**(22)Date of filing : **15.12.1994**(72)Inventor : **IMAMOTO FUMIO
ISHINO YOSHIZUMI
FURUSAWA MITSURU
DOI HIROFUMI****(54) METHOD FOR MAKING TEST GENE SEQUENCE****(57)Abstract:**

PURPOSE: To provide a method for efficiently making diversified variant sequences of a gene while controlling the mutation incidence.

CONSTITUTION: A recombinant plasmid prepared by connecting an exotic gene fragment to a plasmid where a DNA replication is advanced in one-way fashion from a replication starting point is transfected into a mismatched base calibration factor-deleted host bacterium to induce the variant sequence of the exotic gene. In this case, the exotic gene fragment is connected to the plasmid so that the mRNA of the exotic gene is transcribed from the plasmid DNA strand to be discontinuously synthesized in its replication, and by regulating the distance from the plasmid replication starting point to the connected site of the exotic gene fragment, the mutation incidence for the exotic gene is controlled. Thereby, useful plant/animal individuals can be obtained in high efficiency owing to accelerating the evolution speed of an organism or its genome DNA.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

06.12.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-163987

(43) 公開日 平成8年(1996)6月25日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A			
// C 1 2 N 1/21		8828-4B		
		9162-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平6-312262

(22) 出願日 平成6年(1994)12月15日

(71) 出願人 390014535

新技術事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(71) 出願人 594204837

今本 文男

大阪府吹田市古江台1丁目9の3

(71) 出願人 591038141

實酒造株式会社

京都府京都市伏見区竹中町609番地

(74) 代理人 弁理士 西澤 利夫

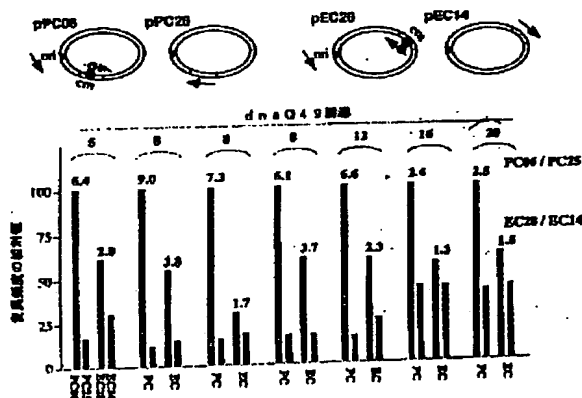
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 検定遺伝子配列作成方法

(57) 【要約】

【構成】 DNA複製が複製起点から一方向に進行するプラスミドに外来遺伝子断片を接続した組換え体プラスミドを、ミスマッチ塩基の校正因子を欠く宿主菌に導入して外来遺伝子の配列変異を誘導する方法であって、複製時に不連続合成されるプラスミドDNA鎖から外来遺伝子のmRNAが転写されるように外来遺伝子断片をプラスミドに接続し、プラスミドの複製起点から外来遺伝子断片の接続位置までの距離を調節することによって外来遺伝子の変異発生率を制御する。

【効果】 遺伝子の多様な変異配列を効率よく、しかもその変異発生率を統制して作成することが可能となる。これによって、生物やそのゲノムDNAの進化速度を速めることによって有用な動植物個体を効率よく得ようとする進化工学に新たな可能性が拓かれる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 DNA複製が複製起点から一方向に進行するプラスミドに外来遺伝子断片を接続した組換え体プラスミドを、ミスマッチ塩基の校正因子を欠く宿主菌に導入して外来遺伝子の配列変異を誘導する方法であって、複製時に不連続合成されるプラスミドDNA鎖から外来遺伝子のmRNAが転写されるように外来遺伝子断片をプラスミドに接続し、プラスミドの複製起点から外来遺伝子断片の接続位置までの距離を調節することによって外来遺伝子の変異発生率を制御することを特徴とする検定遺伝子配列作成法。

【請求項2】 プラスミドの複製起点から外来遺伝子断片の接続位置までを、2500bp以下の距離とすることによって外来遺伝子の不均衡変異発生率を促進する請求項1の検定遺伝子配列作成法。

【請求項3】 プラスミドの複製起点から外来遺伝子断片の接続位置までを、2500bpを超える距離とすることによって外来遺伝子の不均衡変異発生率を抑制する請求項1の検定遺伝子配列作成法。

【請求項4】 外来遺伝子断片の両端に、接続配列からの連続的転写を阻止する構造を付与する請求項1、2または3の検定遺伝子配列作成法。

【請求項5】 組換え体プラスミドを導入する宿主菌が、大腸菌dnaQ49株または大腸菌XL1Red株である請求項1の検定遺伝子配列作成法。

【請求項6】 外来遺伝子を所望の形質に変異させるためのストレス要因存在下で宿主菌を培養する請求項1の検定遺伝子配列作成法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、検定遺伝子配列の作成法に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、2本鎖DNAの不連続(lagging)複製と連続(leading)複製とでは変異の発生頻度が異なることを利用して、遺伝子工学分野や医療分野において有用な遺伝子の変異配列を効率よく、しかもその変異発生率を統制して作成することのできる方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術とその課題】生物の多様な進化は、その構造や機能をコードする遺伝子DNAの突然変異によってもたらされている。従来、このような突然変異は、2本鎖DNAの分裂・複製時に、各々の鎖に同じ割合で生じると考えられてきた。ところが、2本のDNA鎖に突然変異が均等に生じるとすると、最初のDNA配列をそのまま継承する子孫が途中で消失してしまう。環境に変化がない時には同じ形質の生物が生き残るはずであるが、この変異均等説では説明に矛盾が生じる。

【0003】これに対して、この発明の発明者等は、2本鎖DNAの分裂・複製時における突然変異の発生率は2本の新生鎖間で不均衡であり、一方が親鎖のDNA配

列をほぼそのまま継承し、他方により多くの変異が蓄積されるとする「変異不均衡説」を提唱している。この説に従えば、環境に変化がない時にはDNA変異の少ない遺伝情報を受け継いだ個体が生き残り、一方、環境の変動に対してはより適応的な変異を持つ個体が選択されて進化が生じることになる。事実、この発明の発明者等は、この考えに基づいて突然変異がどのように生じるかをコンピュータシミュレーションしたところ、遺伝子が分裂・複製を繰り返しながら世代を経ていくうちに、従来の定説よりもはるかに多様な遺伝子を残せることを確認している。また、分裂・複製時に一方の新生鎖に生じる変異が他方よりも100倍以上多ければ、最初のDNA配列と同じ配列がいつまでも継承され続けることを確認している(J. Theor. Bio., 157, p127, 1992)。

【0004】このように、変異不均衡説は、従来の理論では説明できなかった生物の多様な進化の形態を極めて合理的に説明することができるが、この理論はまた、ゲノムDNAの複製機構の面からもその信憑性が見事に裏付けられている。すなわち、平行2本鎖からなる遺伝子DNAは塩基の相補性を利用して複製を行うが、両方の親鎖をそれぞれ鋳型とする2本の新生鎖の合成は、触媒する酵素の特性により5'→3'の一方方向に限られる。ところが、親鎖である2本鎖DNAの分裂は任意の起点から始まり、一方方向に開列が進行するため、開列の進む方向と合成の方向が一致する新生鎖は簡単な酵素等で触媒されて切れ目なく連続的に合成されるが、開列方向と合成方向が逆になる新生鎖は、岡崎フラグメントを一つ一つ連結しながら不連続的に合成されることになる。当然のことながら、連続的な合成に比べて、不連続な合成にはより複雑な機構が介在することになり、塩基の相補性に誤りが発生する確率が高くなることは容易に想像される。

【0005】そこで、このようなゲノムDNAの特殊な複製機構に基づく変異不均衡説を利用することによって、生物の進化速度を人為的に速めて有益な動植物個体を効率的に得ようとする進化工学に新たな可能性を拓くものと期待される。すなわち、連続鎖の合成精度を本来の高い水準のままにしておいて、不連続鎖の変異発生率を数倍まで引き上げることができれば、その生物集団や特定の遺伝子を絶滅させることなく進化の速度を数倍速めることが可能となる。このような進化工学の原理は、変異が均等に生じるとする従来の理論に基づく変異誘導方法とは全く異なるものであり、実際の生物系におけるその応用が待望されている。

【0006】この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、2本鎖DNAにおける不均衡な変異発生を利用することによって、遺伝子の多様な変異配列を効率よく、しかもその変異発生率を統制して作成することのできる新しい方法を提供することを目的としている。

10

20

30

40

50

【0007】

【課題を解決するための手段】この発明は、上記の課題を解決するものとして、DNA複製が複製起点から一方向に進行するプラスミドに外来遺伝子断片を接続した組換え体プラスミドを、ミスマッチ塩基の校正因子を欠く宿主菌に導入して外来遺伝子の配列変異を誘導する方法であって、複製時に不連続合成されるプラスミドDNA鎖から外来遺伝子のmRNAが転写されるように外来遺伝子断片をプラスミドに接続し、プラスミドの複製起点から外来遺伝子断片の接続位置までの距離を調節することによって外来遺伝子の変異発生率を制御することと特徴とする検定遺伝子配列作成法を提供する。

【0008】以下、この発明の構成と、その好ましい態様について説明する。この発明の方法では、DNA複製が複製起点から一方向に進行するプラスミドに、変異の誘導を目的とする外来遺伝子を含むDNA断片を接続するが、その際、複製時に不連続合成されるプラスミドDNA鎖から外来遺伝子のmRNAが転写されるように外来遺伝子断片の方向を定めてプラスミドに接続することを一つの構成要件とする。すなわち、プラスミドは相補的な2本鎖の環状DNAであり、その分裂・複製が1箇所の複製起点から一方向に進行すれば、例えば内側のDNA鎖は5'→3'方向に連続的な娘鎖(leading鎖)を合成するが、外側のDNA鎖から合成される娘鎖は3'→5'方向の不連続鎖(lagging鎖)となる。そこで、このようなプラスミドに接続された遺伝子は、組換え体プラスミドの複製の度に、ほとんど変異のないleading鎖を鋳型とする新生2本鎖と、より変異の多いlagging鎖を鋳型とする新生2本鎖とに増幅する。従って、遺伝子の方向を調節し、そのmRNAがlagging鎖側から転写するようにすれば、組換え体プラスミドからの発現遺伝子に多くの変異を蓄積することができる。

【0009】また、この発明の方法においては、プラスミドの複製起点から外来遺伝子断片の接続位置までの距離を調節すること構成要件としてもいる。すなわち、以下の実施例にも示すように、この発明の発明者等は、プラスミドの複製起点から外来遺伝子断片の接続位置までが2500bp以下の場合には、leading鎖とlagging鎖における変異発生の不均衡性が大きくなり、一方、それらの距離が2500bpを越える場合には不均衡性が弱まることを見出した。従って、この発明の方法では、外来遺伝子の接続箇所を調整することによって、たとえ変異誘導の条件や複製回数が同一の場合であっても、外来遺伝子の不均衡変異の程度を統制することができる。なお、外来遺伝子断片の接続位置を調整して不均衡変異発生頻度を統制する場合には、その遺伝子断片の両端に、左右の接続配列からの連続的な転写を阻止する構造を付与することによって、接続位置の効果によってのみその変異発生を制御することができる。

【0010】さらに、この発明では、上記の組換え体プ

ラスミドを、ミスマッチ塩基の校正因子に変異を有する宿主菌に導入して変異を誘導することを構成要件としてもいる。このような変異菌としては、DNAポリメラーゼIII ε因子に変異を有する大腸菌KH1379(dnaQ49)または大腸菌XL1Red株を例示することができる。すなわち、様々な生物種において一回のDNA複製で塩基のミスマッチが生じる確率は1塩基対当たり 10^{-10} 以下であると見積もられているが、dnaQ49株やXL1Red株ではこの確率が 10^3 から 10^5 倍も増加する。従って、これらの宿主菌において上記の組換え体プラスミドを分裂・複製させることによって、lagging鎖側にコードされた外来遺伝子の変異発生頻度をさらに増加させることができる。もちろん、上記のとおり、プラスミドの複製起点から外来遺伝子までの距離を長くすれば、たとえこれらの宿主菌を用いたとしても変異発生頻度は低く抑えることができる。

【0011】以下、実施例として、この発明の変異遺伝子配列作成方法についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。

【0012】

【実施例】プラスミドpBR322のColE1型複製起点(ori)を含む断片に、クロラムフェニコール感受性遺伝子(Cm)を含む断片を接続して、図1の上段にそれぞれの構成を示した4種類の組換え体プラスミドを作成した。すなわち、pPC06およびpPC25は、Cmを複製起点から830bpの位置に接続しているが、Cmの方向が逆転しており、pPC06は内側のDNA鎖(lagging鎖)からCmのmRNAを転写し、pPC25は外側のDNA鎖(leading鎖)からCmを転写する。一方、pEC28およびpEC14は、複製起点から2700bpの位置に外来遺伝子Cmを接続しているが、pEC28は内側のlagging鎖からCmを転写し、pEC14は外側のleading鎖からCmを転写する。

【0013】このようにして作成した組換え体プラスミドを、大腸菌KH1380(dnaQ49)のrecA⁻株であるKH1379(dnaQ49)に導入し、クロラムフェニコール含有LB培地において37℃で20時間培養し、任意の時点で生存菌の数を計測してクロラムフェニコールに対する感受性(Cm^s)から耐性(Cm^r)への変異率を算出した。

【0014】結果は、図1下段のグラフに示したとおりである。まず、このグラフに示した結果から明らかなように、クロラムフェニコールに対する感受性(Cm^s)から耐性(Cm^r)への変異発生は、lagging鎖側に遺伝子をコードするpPC06またはpEC28を導入した形質転換菌のほうが、leading鎖側に遺伝子をコードするpPC25またはpEC14を導入した菌より大きいことが確認された。このことは、leading合成よりもlagging合成のほうが変異発生率が大いとする変異不均衡説を明確に指示する結果である。

10

20

30

40

50

【0015】ただし、外来遺伝子Cm^rの位置が複製起点から違いpEC28/14に比べ、遺伝子が複製起点に近いpPC06/25のほうが、外来遺伝子の転写方向の違いによる変異発生率の比率が極端であった。このことから、外来遺伝子から多くの変異配列を誘導する場合には複製起点に近い位置に遺伝子を接続し、一方、遺伝子に多くの変異を誘導しない場合には複製起点から遠い位置に遺伝子を接続すればよいことが判明した。

【0016】なお、このような外来遺伝子の位置効果は、dnaQ49株だけでなく、ミスマッチ校正因子S、TおよびDに変異を有する大腸菌XL1Red株を宿主とした場合にも確認された(図2参照)。次に、複製起点から外来遺伝子までの距離と変異発生率の相違を検討した。この目的のため、図3にその構成を示した組換え体プラスミドpPCシリーズを作成した。このpPCシリーズは、複製起点(ori)の下流460bpの位置に、660bpのCm^r遺伝子を含む全長1642bpのDNA断片を方向を変えて接続し、作成した。なお、このDNA断片の両端には、これを接続するプラスミドDNA配列からの連続的転写を阻止するため、2次構造状のRNA配列を連結した。また、Cm^r遺伝子に示した塩基配列は、この配列中の太字で示したT-A対が耐性遺伝子Cm^rの配列中に挿入されたためにフレームシフトが生じ、下線で示したTAA(終止コドン)によって耐性遺伝子の転写、発現が阻害されていることを示している。従って、このT-A対が点変異によって除去されれば、このCm^r遺伝子はCm^rへ復帰することができる。

【0017】そして、このpPCシリーズにおいては、複製起点から230bpの位置に異なる長さのλDNA断片を挿入して、複製起点からCm^r遺伝子までの距離を調節した。距離の違いとCm^r遺伝子の方向により図3下段右側に示した8種類の組換え体プラスミドを作成した。これらのプラスミドを大腸菌KH1379(dnaQ49)に導入し、37℃で8時間または13時間培養して変異を誘導し、各プラスミドを導入した形質転換菌の生存数を指標としてCm^rからCm^sへの変異率を求めた。

【0018】結果は、図4下段のグラフに示したとおり

である。すなわち、Cm^s遺伝子が複製起点から858bpの位置にあるpPC460と、1414bpの位置にあるpPC461を導入した宿主菌は、それぞれ同位置に変異率の少ないCm^s遺伝子を接続したpPC150およびpPC151を導入した菌に比べ、Cm^rへの変異菌数が、8時間培養で約2倍、13時間培養でも1.3倍から2.8倍も多かった。これに対して、Cm^s遺伝子が複製起点から3111bp(pPC464/154)および4654bp(pPC466/156)の場合には、Cm^s遺伝子の接続方向の違いによる変異発生率の違いがほとんど観察されなかった。これらの結果から、外来遺伝子の変異を多く誘導する場合には、その接続位置を、プラスミドの複製起点から2500bp以下、好ましくは1500bp以下にすればよいことが確認された。また、一方、外来遺伝子を複製起点から2500bpを越える位置に接続すれば、遺伝子の接続方向の違いによる変異発生率の相違を小さくすることができるとも判明した。

【0019】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明の方法によって、遺伝子の多様な変異配列を効率よく、しかもその変異発生率を統制して作成することが可能となる。これによって、生物やそのゲノムDNAの進化速度を速めることによって有用な動植物個体を効率よく得ようとする進化学に新たな可能性が拓かれる。

【図面の簡単な説明】

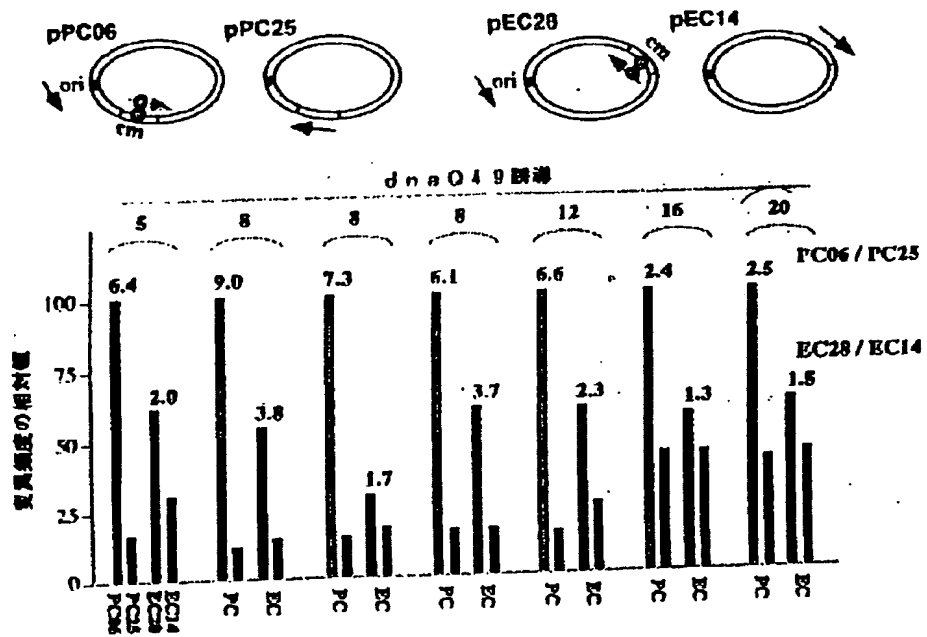
【図1】この発明の有効性を試験するための実施例として作成した組換え体プラスミドの構成図と、それらを導入した大腸菌の変異率の比率を示したグラフである。

【図2】この発明の有効性を試験するための別の実施例として作成した組換え体プラスミドの構成図と、それらを導入した2種類の大腸菌の変異率の比率を示したグラフである。

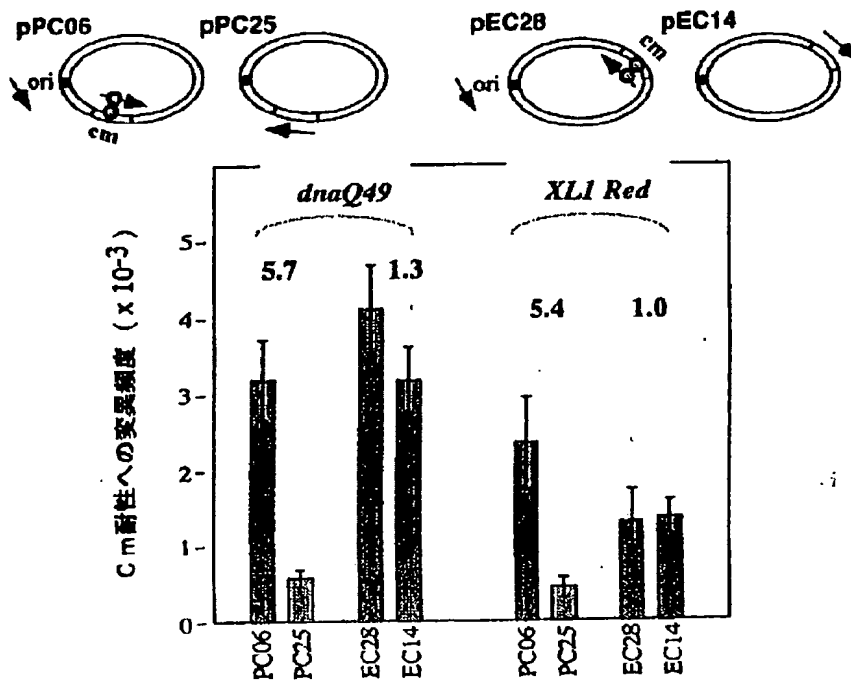
【図3】この発明の有効性を試験するためのさらに別の実施例として作成した組換え体プラスミドの構成図と、このプラスミドに挿入接続したDNA断片の構造図である。

【図4】図3に構成図を示したプラスミドを導入した大腸菌の変異率の比率を示したグラフである。

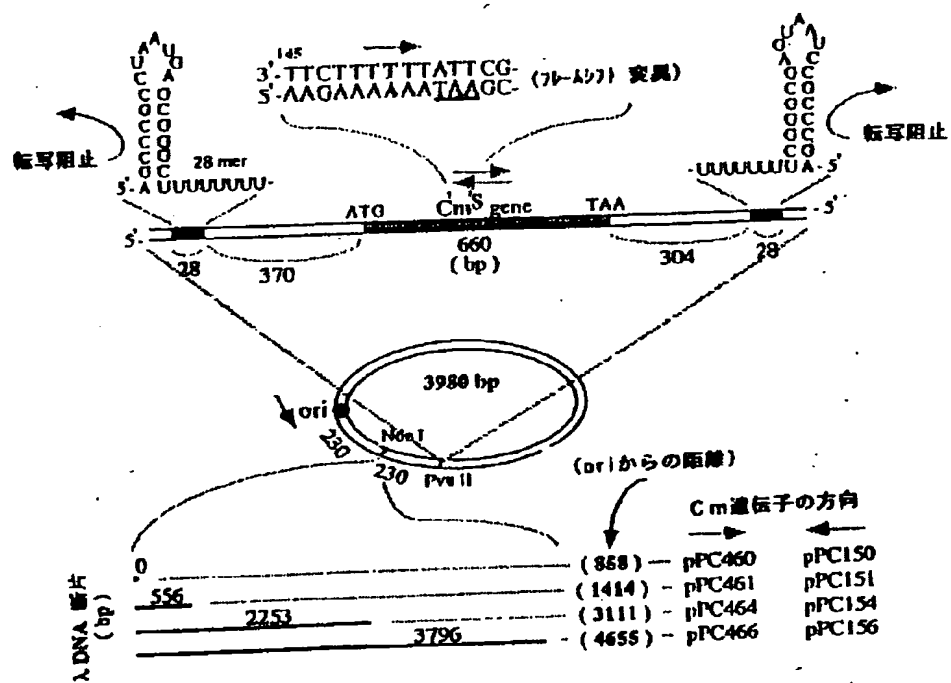
【図1】



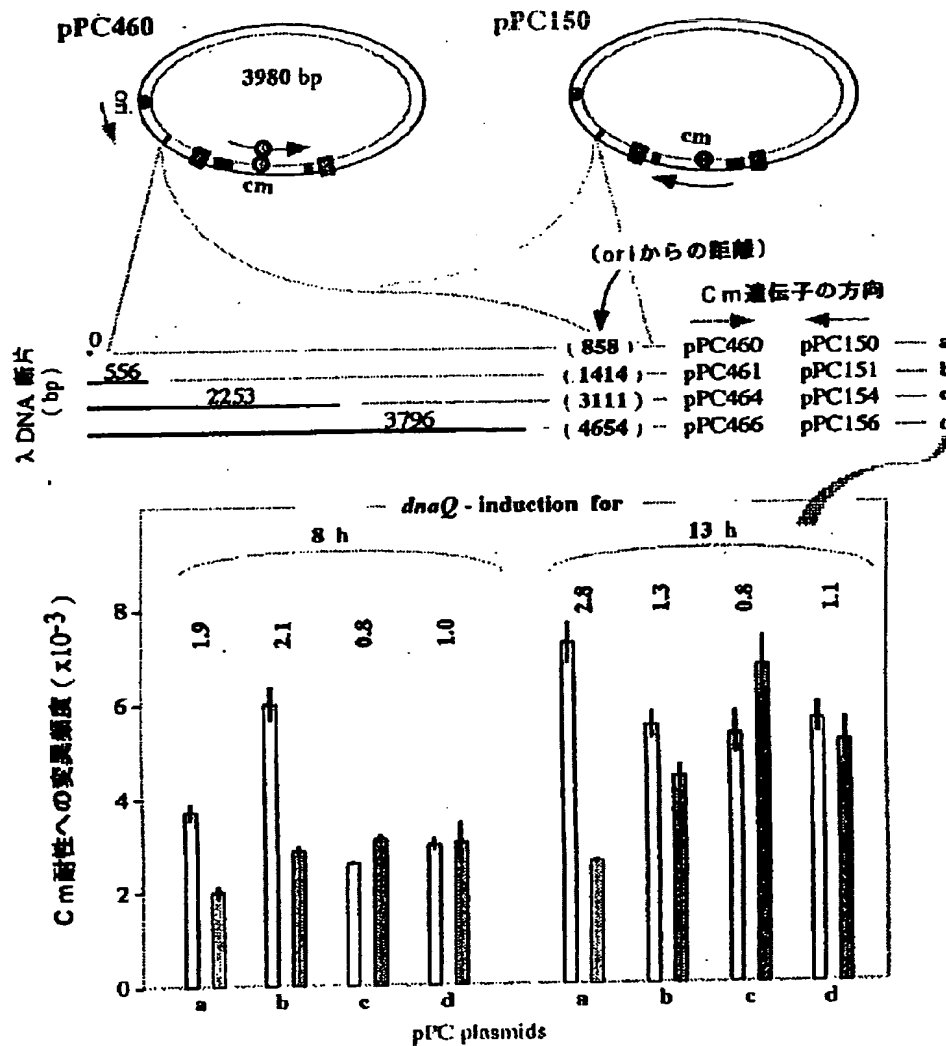
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(71)出願人 592102906
古沢 満
東京都江戸川区西葛西6-6-8 西葛西
パークファミリア605
(71)出願人 000005223
富士通株式会社
神奈川県川崎市中原区上小田中4丁目1番
1号
(72)発明者 今本 文男
大阪府吹田市古江台1丁目9の3

(72)発明者 石野 良純
滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造
株式会社内
(72)発明者 古沢 満
東京都江戸川区西葛西6-6-8 西葛西
パークファミリア605
(72)発明者 土居 洋文
神奈川県川崎市中原区上小田中1015 富士
通株式会社内